

3

BIOSENSOR

Publication number: JP6174679 (A)

Publication date: 1994-06-24

Inventor(s): KISHIMOTO YOSHIHISA

Applicant(s): SUMITOMO METAL IND

Classification:

- International: G01N27/28; G01N27/327; G01N27/28; G01N27/327; (IPC1-7): G01N27/327; G01N27/28

- European:

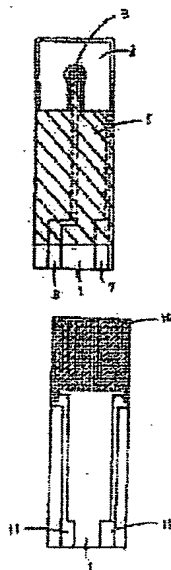
Application number: JP19920330570 19921210

Priority number(s): JP19920330570 19921210

Abstract of JP 6174679 (A)

PURPOSE: To maintain the temperature of an electrode system and a sample liquid when dropping a sample to be constant and to achieve a highly accurate measurement by providing an electrical heating element at the other surface side of an insulation substrate or in an insulation substrate.

CONSTITUTION: An electrode system consisting of at least a measurement electrode 3 and a counter electrode 2 near it is provided on an insulation substrate 1. An electrical heating element 10 is provided in the substrate 1 or on the substrate 1 of the reverse surface of the electrode system. The element 10 is provided with a function for transferring the thermal energy to the electrode system and the sample system rapidly and then maintaining it to be a constant temperature, thus performing measurement stably without being affected by the external air temperature and the sample liquid temperature. Also, it is proper to maintain a desired temperature by applying a specific potential or conducting a specific current value to a printing resistor. Namely, by applying a specific potential to a terminal part 11 of the resistor 10, the surface temperature of the electrode system is maintained to be constant. Also, the sample is dropped on the electrode system, a specific pulse potential is applied between electrode terminals 8 and 7, and current flowing between both electrodes 2 and 3 is measured, thus determining it as response current according to enzyme reaction.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-174679

(43) 公開日 平成6年(1994)6月24日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327				
27/28	3 3 1 Z	7235-2 J		
		7235-2 J	G 0 1 N 27/30	3 5 3 R
		7235-2 J		3 5 3 B
		7235-2 J		3 5 3 J

審査請求 未請求 請求項の数5(全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平4-330570

(22) 出願日 平成4年(1992)12月10日

(71) 出願人 000002118

住友金属工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 岸本 芳久

大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友金属工業株式会社内

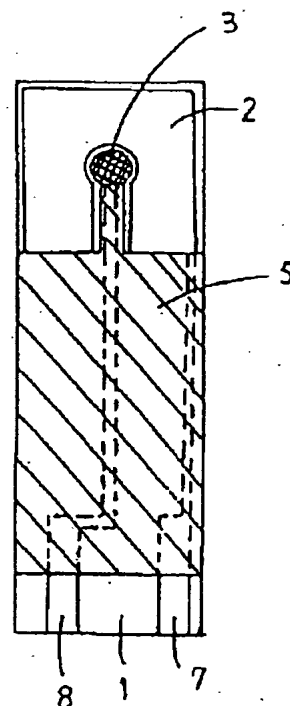
(74) 代理人 弁理士 広瀬 章一

(54) 【発明の名称】 パイオセンサ

(57) 【要約】

【構成】 測定極と対極とからなる電極系を絶縁基板上に設け、該測定極が有機電荷移動錯体結晶を含む電極に酵素および電子メディエーターを固定化したものであるバイオセンサにおいて、絶縁基板に発熱素子を設ける。

【効果】 簡易かつ迅速に、微量の試料でも精度よく生体基質等の濃度を測定でき、さらに、温度に影響されず安定な測定が可能なので、自己血糖値管理への利用に好適である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定極と対極とからなる電極系を絶縁基板の一方の面に設け、該測定極が有機電荷移動錯体結晶を導電層として含む電極に酵素および電子メディエーターを固定化したものであるバイオセンサにおいて、前記絶縁基板の他面側あるいは絶縁基板中に、発熱素子を設けたことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 測定極上、あるいは測定極を含む電極系上に濾液層および／または保液層を設けた請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 濾液層および／または保液層中に抗血凝固剤を担持させた請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 さらに、酵素が固定化されていない補償極を設けた請求項1ないし3のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項5】 酵素が酸化還元酵素である請求項1ないし4のいずれかに記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

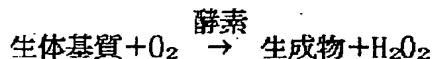
【産業上の利用分野】 本発明はバイオセンサ、特に、血液、尿等の体液成分中に含まれる微量の生体基質の濃度を測定するのに好適な酵素センサに関する。

【0002】

【従来の技術】 酵素の優れた基質特異性を利用した分析法が、臨床分析化学、食品製造、環境化学等の分野で用いられている。特に、臨床分析化学の分野では、グルコース、尿素、尿酸等の生体基質を選択的に検出する酵素センサが開発されている。これらの酵素センサは、酵素電極や白金電極等の電極と酵素固定膜とから構成され、酵素反応による物質変化を電極により電気信号の変化量として読み取ることにより、その酵素が特異的に作用する基質の濃度を測定するものである。例えば、グルコースセンサなどでは、下記式に従い生成または消費される過酸化水素、酸素等の電極活性な物質を電極でモニターして、生体基質濃度を測定する。

【0003】

【化1】



【0004】 ところが、このような原理に基づく酵素センサには次のような問題点がある。基質が反応するためには化学量論的な酸素を必要とするが、実際の測定において、例えばグルコースセンサで糖尿病患者の血中グルコース濃度を測定する場合、体液中の溶存酸素量では不足である。そのため、試料血液を希釈したり、何らかの方法で酸素を補給することが必要である。また、過酸化水素を電気的にモニターする場合、アスコルビン酸のような還元性物質により測定誤差を生じるため、これら誤差を取り除くためには何らかの手段を講じる必要がある。さらに、従来のセンサは酵素固定膜を酸素電極や過

酸化水素電極に装着することが必要であるため、微小化にも限界がある。

【0005】 一方、これらの問題点を解決するため、酵素反応に伴う電子移動を直接検知する酵素電極として、導電性高分子を利用した酵素電極および電子メディエーターを利用した酵素電極が提案されている。しかし、導電性高分子を利用した酵素電極では、溶存酸素の影響を受けないという利点はあるが、応答性が低く、応答時間が長い等の問題がある。さらに、電解重合時に重合膜中に酵素を捕捉するという手法を取る場合は、固定化される酵素量を制御することは難しく、また酵素電極として利用する際、酵素の脱離による経時的な基質応答性の低下は避けることができない。また、電子メディエーターを利用した酵素電極でも電導度が低く応答性、応答時間の点で不十分である他、電子メディエーターをカーボンペースト中に分散させた形態をとるため、電子メディエーターの溶出、脱離に伴う経時的な応答性の低下という問題を有する。

【0006】 ところで、このような酵素電極を用いて実際に生体試料中の特定成分を定量する場合、高精度に測定することはもちろん、試料液の希釈、攪拌等の操作を必要とせず、簡易にかつ迅速に測定できることが望ましい。また、血液等の試料の場合、使用できる試料の量に制約があることが多く、微量試料での測定が望まれる。従来の酵素電極においては、簡易かつ迅速に、また微量の試料でも正確な測定を長期にわたり行えるものはなかった。

【0007】 そこで、本発明者は、これら従来の酵素電極の欠点を解決するものとして、先に、導電性基体表面に有機電荷移動錯体結晶を含有する導電層を設けた酵素電極を提案した（特願平2-244840号）。この酵素電極は、酵素反応に伴う電子移動を直接検知する方式をとることにより、溶存酸素の影響を受けず、また妨害物質の影響も少ないという利点に加え、経時安定性に優れ、長期にわたり高精度な応答を与えることができるという利点を有する。また、本発明者はこの酵素電極においてさらに改善を重ね、酵素反応に伴う電子移動を効率的に行うことができ、より応答性が向上した酵素電極も提案した（特願平3-7908号、特願平3-86884号）。さらに、有機電荷移動錯体結晶を導電層に含有する酵素電極を測定極とし、その近傍に対極を設けることにより微小化バイオセンサを作製し、試料液の希釈、攪拌等の操作を必要とせず、微量試料での測定を可能にした（特願平4-11346号）。また、測定極を含む電極系上に保液層、濾液層を設けることによる改良についても提案した（特願平4-278828）。このようなバイオセンサを自己血糖値管理等の分野に応用する場合、さらに、外気や試料液の温度による応答のばらつきをなくし、安定に高精度に測定することが望まれる。

【0008】

3

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有機電荷移動錯体を含む酵素電極を用いて、試料液の希釈、攪拌を必要とせず微量試料での測定を可能としたバイオセンサにおいて、さらに、外気や試料液の温度による影響を受けず精度よい測定を行うことができるバイオセンサを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、有機電荷移動錯体結晶を含む酵素電極（測定極）と対極とを絶縁基板上に配置したバイオセンサにおいて、絶縁基
10 表面もしくは絶縁基板中に発熱素子を設ければ、試料を滴下した際の電極系および試料液の温度を一定に保つことができ、安定に精度よく測定できることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】（発明の要旨）本発明は、測定極と対極とからなる電極系を絶縁基板の一方の面に設け、該測定極が有機電荷移動錯体結晶を導電層として含む電極に酵素および電子メディエーターを固定化したものであるバイオ
20 センサにおいて、前記絶縁基板の他面側あるいは絶縁基板中に、発熱素子を設けたことを特徴とするバイオセンサを要旨とする。

【0011】さらに、本発明は、上記バイオセンサにおいて測定極上あるいは測定極を含む電極系上に濾液層および／または保液層を設けたバイオセンサ、およびこのバイオセンサの濾過層および／または保液層に抗血凝固剤を担持させたバイオセンサに関する。これらのバイオセンサには、酵素が固定化されていない補償極を設けてもよい。また、本発明のバイオセンサでは特に酵素が酸化還元酵素である場合に好適である。

【0012】

【作用】本発明のバイオセンサは、絶縁基板上に少なくとも測定極とその近傍に設けた対極とからなる電極系を有し、その絶縁基板に発熱素子を設けた構造である。本発明のバイオセンサでは濾液層および／または保液層で電極系を覆うことにより、さらに極微量の試料でも精度
30 よい測定が可能になり、また、濾液層および保液層の少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させて、より迅速な測定を行なうこともできる。また、酵素が固定化されていない補償極を設けて、試料中のタンパク質等の吸着、副反応の影響を除き、より高精度での測定を行うことも
40 できる。

【0013】本発明のバイオセンサで用いる絶縁基板は、電気絶縁性を有し、試料液に対して基板中の不純物の溶出等がなく、後述の発熱素子との密着性があり、適度な熱伝導性を有するものであれば、リジッド、フレキシブルどちらでも可能であり、特に制限されるものではない。このような観点から、有機系材料としては、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、アクリル樹脂等の汎用の熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエス
50

4

テル樹脂、メラミン樹脂等の熱硬化性樹脂等が使用できるほか、これら樹脂とガラス繊維、紙基材、無機充填材等を組み合わせた複合材料等も使用できる。また、無機系材料としてはアルミナ等のセラミックス、ガラス板等を使用することができる。

【0014】本発明のバイオセンサでは、絶縁基板中、あるいは電極系裏面の絶縁基板上に発熱素子を設ける点
10 が特徴である。酵素反応は一般に温度の影響を受けやすく、例えばグルコースオキシダーゼの場合、40℃付近までは温度上昇とともにその反応速度は大きくなる。従って、酵素反応を利用するバイオセンサを自己血糖値管理等に利用する場合、測定時の外気や試料液の温度により電極反応が影響をうけ、その結果応答がばらつき、安定した応答が得られにくいことがある。本発明バイオセンサでは、このような温度変化の影響による誤差が少なく、安定に高精度で測定しうる。

【0015】発熱素子としては、電氣的、光学的、力学的外部エネルギーの印加にたいして一定量の発熱機能を有し、その熱エネルギーを速やかに電極系および試料液に伝達して、一定温度に保持する機能を有している素子
20 であれば特に制限されない。得られるバイオセンサのコスト、制御の容易性、装置の簡便性、温度調節性の精度等の観点からは、抵抗体に所定の電位を印加、あるいは所定電流値を通電して発熱させ、所望の温度に保つのが好適である。特に、抵抗素子として印刷抵抗体を用いれば、絶縁基板上に容易に設けることができるため、発熱素子としてより好ましい。

【0016】印刷抵抗体を設ける方法としては、一般の電気、電子回路に用いられる抵抗ペーストをスクリーン印刷等の方法を用い、所定の形状、所定の厚みに印刷して抵抗体とすることができる。抵抗ペーストとしては、カーボン、グラファイト等を導電性フィラーとし、バインダーとしてエポキシ樹脂、フェノール樹脂等の熱硬化性樹脂を用いるポリマー型厚膜抵抗ペースト、あるいは酸化ルテニウム等とガラスフリット等からなり、焼結により得られるサーメット型厚膜ペースト等を用いることができる。これらはいずれも印刷後加熱過程を経る必要があるが、測定極を構成した後に抵抗体を設ける場合は、加熱過程の必要性がないUV硬化型、電子線硬化型カーボンペーストを用いることができる。
30

【0017】上記のような印刷抵抗体を設けるには、例えば、電極系を設けた絶縁基板の裏面に抵抗体を印刷する、あるいは抵抗体が直接外気に接触しないように、抵抗体を印刷した絶縁基板に別の基板を張り合わせる等の適宜方法によることができる。

【0018】測定極は、導電性基体上に有機電荷移動錯体結晶を含む導電層を形成させ、酵素と電子メディエーターの両者を固定化したものである。有機電荷移動錯体結晶は導電性基体上の絶縁性高分子フィルム内に成長させたものであってもよいが、導電性基体上に直接形
50

5

成させたものが好ましい。

【0019】有機電荷移動錯体結晶を絶縁性高分子フィルム内に成長させて導電層を形成するには、例えば、導電性基体上に、電子供与体層を設け、その上にポリビニルブチラール、ポリエステル、ポリアミド、ポリエテルアミド等の絶縁性高分子の被膜を設け、これを有機電子受容体を含有する溶液と接触させる方法がある。この導電層に酵素、あるいは酵素と電子メディエーターを固定化して酵素電極を製造できる。

【0020】導電性基体の表面に直接形成させた有機電荷移動錯体結晶からなる導電層は、以下に示す方法等により、厚さ方向に結晶を成長させて容易に得ることができ、厚さ方向に良好な導電性を有するものである。

【0021】導電性基体としては、銅、銀、白金、金等の金属やカーボン電極の他、これらの導電性材料からなる導電層を蒸着等の手段により表面に設けた基体、あるいはこれらの導電性材料の粉末を含有するペーストから作成した基体等が使用できる。

【0022】ここで、有機電荷移動錯体（以下、有機CT錯体と称する）とは、有機電子受容体と電子供与体とから、両者の間の電荷移動反応に伴い形成される化合物である。この有機CT錯体の形成に用いる有機電子受容体としては、特に制限されないが、シアノメチレン官能基を有する化合物が好ましく、中でもジシアノメチレン官能基と、キノンあるいはナフトキノン骨格とを有する化合物が好適である。このうちでも特に、7,7',8,8'-テトラシアノキノジメタン(TCNQ)はCT錯体形成能が強く、得られる有機CT錯体の電気伝導度が高いため応答時間、応答性で有利である。また工業的にも比較的入手が容易であることから好適である。

【0023】有機CT錯体の形成に用いる電子供与体としては、使用する有機電子受容体と、導電性を有するCT錯体を形成しうるものであれば、特に制限されるものではなく、有機、無機のいずれでもさしつかえない。具体的には、無機材料としては銅、銀、コバルト、ニッケル、鉄、マンガンなど、また有機材料としては、テトラチアフルバレン、テトラセレンフルバレン等のテトラセン類、及びその誘導体、あるいは2,2'-ビスピリジニウム、N-メチルフェナジニウム等、公知の電子供与体を使用することができる。

【0024】有機CT錯体結晶を成長させるには、液相および気相中での公知の方法を使用できる。液相中で有機CT錯体結晶を成長させる方法には例えば以下の方法がある。まず、基体表面に電子供与体層を設けたものか、あるいは電子供与体としても機能する銅板等の基体の一部ないしは全部を、有機電子受容体を含有する溶液と接触させる。これにより、溶液中の有機電子受容体は、基体の表面を構成する電子供与体との間でCT錯体化反応を起こし、錯体が成長する。

【0025】有機電子受容体含有溶液の調製に使用する

6

溶媒としては、極性のある非プロトン溶剤、例えばアセトニトリル、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルホスホルアミド、メチルエチルケトン等が好適である。この溶液における有機電子受容体の濃度は、溶剤100重量部に対して通常0.01重量部～飽和濃度、好ましくは0.1重量部～飽和濃度が適当である。

【0026】有機CT錯体の形成は、通常、10～30℃の温度で行うが、用いる有機電子受容体と基体表面の電子供与体の組み合わせによっては、CT錯体化反応が急激に進み、緻密で均一な目的層が得にくい場合がある。そのような場合は、必要に応じて溶液、基体、雰囲気温度を下げたり、溶液の濃度を低くすればよい。また逆に、錯体化反応が遅く、有機CT錯体結晶が必要な厚みに成長するのに長時間を要する場合は、必要に応じて、加熱することができる。

【0027】有機電子受容体含有溶液の接触時間は、用いる有機電子受容体と電子供与体との組み合わせや目的とする導電層の厚みに大きく依存するが、一般に10秒から1時間程度である。気相成長法としては一般に真空蒸着法を用いることができる。まず、基体表面に電子供与体層を設けたものか、あるいは電子供与体としても機能する銅板等を、減圧下（ $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-7}$ torr）に設置し、錯体結晶を成長させたい部分を適当な温度（100～300℃）に加熱保持する。次に、電子受容体を徐々に加熱し、気化させる。これにより、基体表面に到達した電子受容体分子と、基体表面の電子供与体との錯体化反応により錯体が成長する。この際、導電層の厚みは基体温度、電子受容体の気化速度等により容易に制御することができる。

【0028】このような液相法あるいは気相法により作成した有機CT錯体は、一般に微細な針状結晶となり、基板面に対して垂直方向に成長する。この有機CT錯体からなる導電層の厚みは特に制限されるものではないが、通常0.01～50μmの範囲であり、好ましくは0.1～10μmである。

【0029】上述の如く、導電層はその厚み方向に成長した微細な針状結晶からなり、そのため導電層の表面は微細な凹凸を有する構造となる。従って、後述の酵素や電子メディエーターの固定化の際には、酵素や電子メディエーターをこの微細な凹部に捕捉することができ、それらの固定化が容易となる。また、微細な針状結晶であるため電極部の実際の表面積を広くとることができ、その結果、酵素および電子メディエーターの固定化量を増大させ、酵素電極の出力として得られる電流密度を大きくすることが可能となる。

【0030】この導電層の厚みが上記範囲以下で薄すぎる場合、十分な表面積を得ることができず、その結果出力電流値が小さくなる。また、逆に上記範囲を超えて厚すぎる場合は、導電層自体の抵抗値が大きくなる。従っ

て、酵素電極として使用する場合、電圧印加の際、電極表面での電圧降下を起こすことになる。また、この有機CT錯体自体、力学的な強度は大きくないため、厚すぎると構造的な欠陥を生じやすくなる。

【0031】導電層は必要に応じ、洗浄、乾燥し、次いで導電性基体と導電層からなる電極に、水不溶性高分子を用いて酵素および電子メディエーターを導電層に接するように固定化する。あるいは、使い捨て等、再利用性が要求されない場合には、この水不溶性高分子を使用することなく酵素および電子メディエーターを固定化して

【0032】酵素は、対象とする物質や目的とする化学反応に応じ、酵素の基質特異性及び反応特異性を考慮して適宜選択することができる。使用しうる酵素は、特に制限されないが、例えばグルコースオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ペニシリナーゼ等が挙げられる。また、酸化還元酵素と補酵素との組み合わせも可能である。

【0033】使用する電子メディエーターは、酵素反応に伴う電子移動を効率よく行うことができる、すなわち、酵素から有機CT錯体への電子移動をスムーズに行わせるものであればよい。例えば、酸化酵素により基質を酸化する反応の場合は、還元型となった酵素から容易に電子を受取り、電子メディエーター自身は還元型となり、かつ導電層表面での電極反応により電子を電極へ供与し、酸化型に戻る性質を有するものである。このような電子メディエーターとしては、フェロセン、1,1'-ジメチルフェロセン、フェロセンカルボン酸、フェロセンカルボキシアルデヒド等のフェロセン誘導体、ハイドロキノ、クロラニル、ブロマニル等のキノ類、フェリシアンイオン、オクタシアノタングステン酸イオン、オクタシアノモリブデン酸イオン等の金属錯体イオン等が好適である。

【0034】有機CT錯体からなる導電層に、水不溶性高分子を用いて、酵素および電子メディエーターを固定化する方法としては次のような方法が可能である。

(1) 前記導電層上に酵素および電子メディエーターを含む溶液を塗布、乾燥させ、ついで水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、酵素および電子メディエーターからなる中間層および水不溶性高分子被覆層からなる3層を設ける。

(2) 前記導電層上に酵素および電子メディエーターを含む水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、酵素および電子メディエーターを含む水不溶性高分子被覆層からなる2層を設ける。

(3) 前記導電層上に酵素を含む溶液を塗布、乾燥させ、ついで電子メディエーター、あるいは電子メディエーターと酵素を含有する水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、酵素からなる

中間層、および電子メディエーターあるいは電子メディエーターと酵素を含む水不溶性高分子被覆層からなる3層を設ける。

(4) 前記導電層上に電子メディエーターを含む溶液を塗布、乾燥させ、ついで酵素あるいは酵素と電子メディエーターとを含有する水不溶性高分子溶液を塗布、乾燥させることにより、導電性基体上に導電層、電子メディエーターからなる中間層、および酵素あるいは酵素と電子メディエーターとを含む水不溶性高分子被覆層からなる3層を設ける。

【0035】酵素および電子メディエーターの固定化は、上記方法が簡便で好適であるが、これらに限定されることなく、公知の共有結合法、イオン結合法、吸着法、包括法、架橋法等を用いることも可能である。

【0036】水不溶性高分子としては、容易に均一に成膜することができ、酵素、電子メディエーターを均一に分散固定し、かつ酵素電極として使用する際、試料溶液中で溶解、膨潤して酵素、電子メディエーターの溶出による出力の低下を招くことのないものであれば限定されることなく使用できる。さらに、導電層中にピンホールが生じていると酵素電極として使用する際、基体あるいは電子供与体の試料溶液中への溶出の可能性があるが、水不溶性高分子層はピンホール部を覆うことにより溶出を防止する。

【0037】このような水不溶性高分子には、ポリビニルブチラール、ポリエステル、ポリアミド、ポリエステルアミド等の熱可塑性ポリマーが例示でき、これらの1種または2種以上を使用することができる。酵素、電子メディエーターの固定方法に応じ、また基質の拡散性等を考慮して適宜ポリマーを選択することができるが、例えばポリマービニルブチラールは水不溶性でありながら親水性、吸水性を有し、しかも非常にミクロなポアを有するため好適である。

【0038】酵素および電子メディエーターを含有する水不溶性高分子で導電層を被覆するには、水不溶性高分子を適当な有機溶剤で溶解させた溶液中に、酵素および電子メディエーターを溶解もしくは均一に分散させ、これを導電層に直接塗布、乾燥させることにより行うことができる。酵素、電子メディエーターを分散させて使用する場合は、水不溶性高分子が析出ししない範囲で、酵素、電子メディエーターの良溶媒である水等を適宜添加すると酵素、電子メディエーターの分散、溶解性を向上させて固定化を効率に行える。得られた酵素電極は、純水あるいは緩衝液等で洗浄して、完全に固定化されていない酵素、電子メディエーターを取り除いた後、使用に供することができる。また、この酵素電極をさらに電子受容体溶液に浸漬する等の手段で有機CT錯体を成長させておけば、膜全体の導電性を高め、大きい応答電流が得られる点で有利である。

【0039】上記のように、酵素および電子メディエー

ターを含有する水不溶性高分子で導電層を被覆する場合、酵素から有機CT錯体、酵素から電子メディエーター、あるいは電子メディエーターから有機CT錯体のへのスムーズな電子移動性を確保して応答性をよくするには、固定膜は薄い方がよい。例えば10Å~10μm好ましくは100 Å~1 μmである。また必ずしも均一な膜である必要はなく、酵素と有機CT錯体、酵素と電子メディエーター、あるいは電子メディエーターと有機CT錯体が直接接触するようにすればよい。

【0040】また、水不溶性高分子で、酵素および電子メディエーターからなる中間層を被覆する場合は、酵素と基質との接触、および残存しているピンホールの被覆を考慮して0.01~10μm好ましくは0.1~5 μm程度の厚さとすることが望ましい。こうして得た酵素電極は、導電性基体上に設けた導電層上に酵素と電子メディエーターが接触するように固定した構造であり、従来の過酸化水素電極、酸素電極等に比べ構造的に簡単であり、小型化が可能である。また、有機CT錯体結晶からなる導電層は、酵素との間で電子移動が容易であるのみならず、従来電子メディエーターとして使用されていたフェロセン類等と比較して、その結晶層の電気伝導度は著しく大きい。これは、これら有機CT錯体が発達した針状結晶を構するため、同じ含有量でも膜中の導電パス数が多くなり、電子移動に有効に寄与するためと考えられる。また、導電層表面に電子メディエーターが固定化されているため、有機CT錯体と酵素が接触しているにもかかわらず構造的に電子移動が起こりにくい部分においても、スムーズな電子移動性を確保し、応答性を向上させることが可能となる。また、有機CT錯体結晶をポリマーを用いずに導電性基体上に直接成長させると、針状結晶の微細な凹凸表面が得られるため、導電層に直接接触する酵素や電子メディエーターの量を多くすることができ、酵素電極の応答性をより一層高めることができる。

【0041】対極は、測定極あるいは補償極に一定電位を印加した時、それらの電極での電流が支障なく流れるようにするため、電極自身の抵抗が小さく、なるべくそれ自身が測定試料中で分極せず、また対極での反応生成物が測定極での反応を妨害したり、それ自身が反応することのない特性を有するものを使用する。このような観点から、白金、金、銀、銅等の金属や、カーボン電極の他、これらの導電性材料からなる導電層を蒸着、スパッタ等の手段により基体表面に設けたり、あるいはこれらの導電性材料の粉末を含有するペーストから作成することにより得たものが対極として使用できる。また、例えば銀を使用する場合、アノード分極等の手段によりその表面にAgClを析出させ、溶液中で電気化学的に安定させたものも好い。

【0042】対極と測定極は種々の形状で設けることができるが、製造コスト、工程の簡便さ、測定に必要な試料の容量等の観点から、同一平面上に設ける方法が

好適である。同一支持体上に設ける場合は、絶縁基板上に銅、銀、金、水銀等の金属層を蒸着、スパッタ等により形成し、測定極における導電性基体および対極とする。また、測定極において導電性基体上に直接形成させる有機CT錯体を、同様にして対極上にも成長させ、これを対極として使用してもよい。この場合、測定極と対極とを同一支持体に配置した構造においては、測定極の有機CT錯体を成長させる工程において同時に対極を作製することができ、工程が簡便であるという利点がある。

【0043】補償極は、電極自身の抵抗が測定極の抵抗と同程度であり、試料液中のタンパク質、電解質、生体成分等と特異的に反応せず、測定極における酵素反応以外の電気化学的副反応や吸着による影響を同程度に受けるものであれば、特に制限されるものではないが、その形状は電流値の補償を行うという目的から、同一形状か少なくとも同一面積であることが好ましい。電極系を同一支持体に設ける場合、酵素を固定化する以外は測定極の作製と同時にかつ同様に補償極を作製することができる。例えば、測定極において導電性基体上に直接有機CT錯体を形成させる工程、および水不溶性高分子を塗布する工程において同時に補償極を作製することができ、工程が簡便になる。

【0044】なお、本発明のバイオセンサーを用いた測定では、参照電極を使用せずに行うことが可能である。このような場合、対極の面積は測定極の面積の2倍以上、好ましくは10倍以上であることが望ましい。これは、測定時に印加する電位差が主に測定極にかかるようにすることにより、高精度に定量するためである。

【0045】本発明では、上記のようにして得た電極系上にさらに濾液層および/または保液層を設けてもよい。濾液層は試料中の比較的大きい妨害物質による影響を少なくする目的で設ける。また保液層は微量の試料を保持し、かつ均一に拡散させるために設ける。これらはそれぞれの目的のために単独で設けてもよいが、両層を同時に設けるのが好ましい。また、濾液層および/または保液層は、少なくとも測定極を覆うように設置すればよく、測定極のみ、あるいは測定極と対極を覆う。補償極を設ける場合はさらに補償極を覆ってもよい。また濾液層および保液層の両方を設ける場合は、電極上に保液層、次いで濾液層の順に設けるのが好ましい。

【0046】保液層としては、微量の供給試料に対して吸収性があり、試料を電極系上に一様に拡散することができるものを使用する。このような観点から、水溶液系の生体試料の場合には吸水性高分子が好適であり、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、メチルセルロース、デンプン系あるいはアクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系もしくは無水マレイン酸系のポリマーが好適である。これらの高分子物質は容易に水溶液とすることができるので、適当な濃度の水溶液を電極上に塗布、乾燥することにより必要な厚さの薄膜を

形成しうる。また、レーヨン等の親水性不織布を用い、毛細管現象を利用して供給試料を電極まで供給することも可能である。親水性不織布を用いる場合は、親水性粘着剤で貼付したり、機械的に設置したりする方法で電極上に設ける。保液層の厚さは0.1～10 μm 程度である。

【0047】濾液層は、供給する試料中に含まれる細胞、赤血球、タンパク質等の比較的大きな妨害物質の電極表面上への拡散を抑止し、なおかつ測定対象となる基質を透過させる機能を有するものである。このような機能を有する材料としては、ポリカーボネート、セルロースアセテート、ナイロン不織布、レーヨン、セラミックス等の多孔体が好適であり、その孔径が通常0.001 μm ～10 μm 、好ましくは0.01 μm ～1 μm のものを使用する。濾液層の形成は、電極上あるいは保液層の上に高分子物質の溶液を塗布、乾燥することにより行うか、あるいは多孔体の薄膜を機械的に密着させる等の方法で設置することにより行うことができる。

【0048】濾液層および/または保液層を設けたバイオセンサでは、濾液層または保液層上に試料を直接滴下して測定することができる。両層を設けた場合、濾液層で妨害物質が除去され保液層に浸透した試料は電極上で一様に拡散するため、微量の試料の場合でもそのまま使用して精度よく測定することができる。

【0049】濾液層および保液層には、これらの層の少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させれば、測定試料として採血したままの全血を使用しても迅速、安定に測定ができる。血液は粘性が高く、電極に滴下後、濾液層あるいは保液層を通過して酵素固定化層に到達させ基質濃度に応じた出力電流を得るには1分以上を要していた。これは、血液が大気に接触した瞬間から凝固が始まり、徐々に増粘するためであると考えられる。抗血凝固剤を用いると例えば15秒程度の短い時間で酵素固定化層に達し一定の出力電流値が得られる。使用する抗血凝固剤としてはフッ化ナトリウムが安定で取扱も容易であるため好適であるが、その他、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸も使用でき、試料液の通過時間を短縮させ、迅速に応答電流が得られるという効果を発揮する。抗血凝固剤を担持させる方法としては、濾液層や保液層を形成する際、その塗布溶液中に予め所定濃度に抗血凝固剤を溶解もしくは分散させた溶液を用いる方法がある。

【0050】本発明のバイオセンサに電位を印加して酵素反応による応答電流を測定する際は、パルス電位を印加するのが好ましい。定常状態電流の印加では、電極の表面状態が目的以外の電気化学反応等により変化するので、測定誤差を生じやすくなる。パルス電位を印加すれば、このような電極の劣化を極力低減でき、安定化時間が短いことから好適である。また、補償極を設けたバイオセンサを用いた測定では、測定極と対極、および補償極と対極との間に連続して、あるいは同時に所定の電

位を印加し、それにより両電極間を流れる電流値を測定し、両者の間の電流値の差を酵素反応による応答電流として定量することができる。

【0051】本発明のバイオセンサを用いれば、グルコース等の糖分、乳酸、アルコール等の血液や尿中の微量生体物質や、食品加工プロセスにおける糖分、アルコール分等を測定できる。本発明のバイオセンサでは、試料を希釈、攪拌することなく血液のような試料でもそのまま使用でき、また試料が微量であっても高精度で簡便に分析することが可能であるのに加え、外気温度や試料液温度に影響されず安定した測定が可能である。

【0052】

【実施例】

【0053】

【実施例1】両面銅張りガラスエポキシ基板（松下電工製R-1701）をエッチングして図1に示す形状の測定極部（直径1.5mm）および対極部を形成し、その裏側に図2の端子部分を形成し、さらに全面を電解質銀めっきして電極とした。次に、表側は、電極部を残してエポキシ樹脂塗料をスクリーン印刷してモールドした。裏側には、図2に示す形状でポリマー型厚膜抵抗ペーストを印刷し、硬化させて厚さ約20 μm の印刷抵抗体（面積抵抗約1K Ω /□）を得た。表側の電極部のうち、対極部は0.1M塩酸中で0.4mA/cm²の電流密度で2分間アノード分極させ、表面に塩化銀を析出させた。

【0054】7,7',8,8'-テトラシアノキノジメタン（試薬、キシダ化学製、以下TCNQと略す）1.0gをアセトニトリル（試薬、スペクトル用）10mg中に加えてTCNQの飽和溶液を調製した。このTCNQ飽和溶液を2 μl 測り取り、室温下で上記電極の測定極部に滴下、自然乾燥した。この操作を計5回繰り返して、測定極部の全面に濃紫色の微細な針状結晶を有する有機CT錯体薄膜を形成させた。

【0055】グルコースオキシダーゼ（*Aspergillus niger*由来、Sigma社製、Type VII）40mgを1mlの100mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した後、4 μl を測り取り、上記測定極部に塗布風乾した。

【0056】ポリビニルブチラール樹脂〔商品名：エスレックB、BX-L、積水化学工業（株）製〕1.0gおよび1,1'-ジメチルフェロセン〔試薬、東京化成（株）製〕1.0gをエチルカルビトール2.5gに溶解して還元型メディエーターを含有する組成物とした。この組成物をスクリーン印刷機を用いて前記測定極部に印刷した後、80℃中10分間乾燥して約3 μm の厚みを有する還元型メディエーターを含有する層を形成した。

【0057】次に、前出のTCNQ溶液を1 μl 測り取り、上記測定極上に塗布、風乾させた後、純水で洗浄した。カルボキシメチルセルロースの1重量%、およびブッ化ナトリウム2重量%を含む水溶液を5 μl 測り取り、測定極、および対極上に塗布、乾燥した後、ポリカーボネートの塩化メチレン溶液を塗布、乾燥してセンサを作製

した。

【0058】裏面の抵抗体の端子部に電位を印加し、電位を調整しながら電極面の表面温度を約40℃に保った。この状態で、このセンサを図3に示す各雰囲気温度内に設置し、10mMのグルコース濃度の全血試料5 μ lを上記電極系上に滴下して、測定極および対極の全面を覆った。そのまま1分間放置した後、対極に対して、0.25Vのバルス電位を測定極に印加して、電位印加5秒後の電流値を測定した。同様にして得られた各雰囲気温度での結果を図3に示す。このように、本発明のバイオセンサでは雰囲気温度の変化による影響は小さく、高精度に測定できることがわかった。

【0059】

【比較例1】実施例1において、電極裏面の抵抗体に電位を印加せず、実施例1と同様にして測定した結果を図3に示す。この場合、雰囲気温度野変化に対して応答電流は大きく変化する。

【0060】

【実施例2】片面銅張フレキシブルポリイミド基板をエッチングして、図4に示す形状の、測定極、対極、および補償極を有する電極パターンを作製し、実施例1と同様にして対極を作製し、実施例1と同様に測定極部および補償極部上に導電性有機電荷移動錯体薄膜を形成した後、同様に測定極部にのみ酵素溶液を塗布した。

【0061】TCNQ5.0gを300 mlのアセトン中に室温で懸濁させ、TCNQと当量のジメチルフェロセンのアセトン溶液を徐々に滴下し、さらに2時間攪拌した後、濾過、乾燥してジメチルフェロセン—TCNQ錯体を得た。

【0062】ポリビニルブチラル樹脂1.0 g、上記ジメチルフェロセン—TCNQ錯体を0.7 g、TCNQを0.3g測り取り、2.5 gのエチルカルビトールを加え、乳鉢によく混練して酸化型メディエーターを含有する組成物を作製した。これを実施例1と同様にして、スクリーン印刷法により、測定極部および補償極上に印刷、乾燥して、厚み約4 μ mの酸化型メディエーターを含有する層を両電極上に作製した。

【0063】さらに、測定極を含む電極系の全面に、保液層として3重量%のポリビニルアルコール、およびヘパリン2重量%を含む水溶液を塗布、乾燥した後、濾液層として、酢酸セルロースのアセトン溶液を塗布、乾燥してセンサを作製した。

【0064】これとは別に、ガラス板に図5に示す形状の端子部分を銀ペーストで作製し、さらにポリマー型厚膜抵抗ペーストを図5に示す形状に印刷した（抵抗体膜厚約20 μ m）。この抵抗体上に、前記電極系が乗るように張り合わせてセンサとした。

【0065】このセンサを用い、実施例1と同様にして印加電位を調整しながら、電極表面の温度を約40℃と

し、図6に示す雰囲気温度内に設置した。この電極系上にグルコース濃度20mMの全血試料5 μ lを滴下し、保液層を通して電極系の全面を試料液で覆った。そのまま30秒放置した後、対極に対して0.25Vのバルス電位を測定極に印加し、印加5秒後の電流値を測定した。引き続き、対極に対して0.25Vのバルス電位を補償極に印加し、同様に印加5秒後の電流値を測定した。測定極および補償極で得られた両者の電流値の差を応答電流とした。図6に示すように、本発明バイオセンサを使用した場合、雰囲気温度の影響を受けず、ほぼ一定の応答電流が得られた。

【0066】

【比較例2】実施例2において、ガラス板上の抵抗体に電位を印加せず、実施例2と同様にして測定した結果を図6に示す。この場合、雰囲気温度の変化に対して応答電流は大きく変化する。

【0067】

【発明の効果】本発明によれば、有機電荷移動錯体を電極材料に利用した酵素電極を用い、長期にわたり高精度で、しかも微量試料でも簡便に測定することができるバイオセンサにおいて、さらに、発熱素子を設けることにより、外気温度や試料液温度に影響されず、常に安定して高精度な測定が可能なバイオセンサを提供できる。また、電極上に濾液層や保液層を設ければ、高濃度基質の場合でも良好な応答性を有し、また極微量の試料でも測定可能となる。さらに、濾液層および保液層に少なくとも1層中に抗血凝固剤を担持させれば、より迅速な測定を行なうことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明バイオセンサの電極面を示す図である。

【図2】本発明バイオセンサの電極面の裏面を示す図である。

【図3】実施例1および比較例1で測定した雰囲気温度と応答電流の関係を示す図である。

【図4】本発明バイオセンサの電極面の他の例を示す図である。

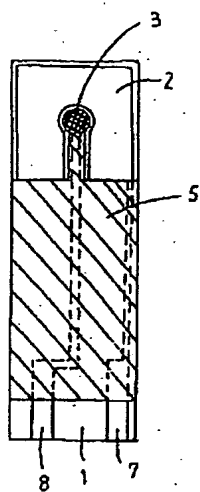
【図5】本発明バイオセンサの電極面の裏面の他の例を示す図である。

【図6】実施例2および比較例2で測定した雰囲気温度と応答電流の関係を示す図である。

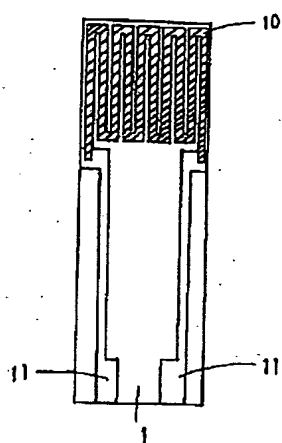
【符号の説明】

- | | |
|----------|----------|
| 1：基板 | 2：対極 |
| 3：測定極 | 4：補償極 |
| 5：エポキシ樹脂 | 6：リード部 |
| 7：対極端子 | 8：測定極端子 |
| 9：補償極端子 | 10：印刷抵抗体 |
| 11：抵抗体端子 | |

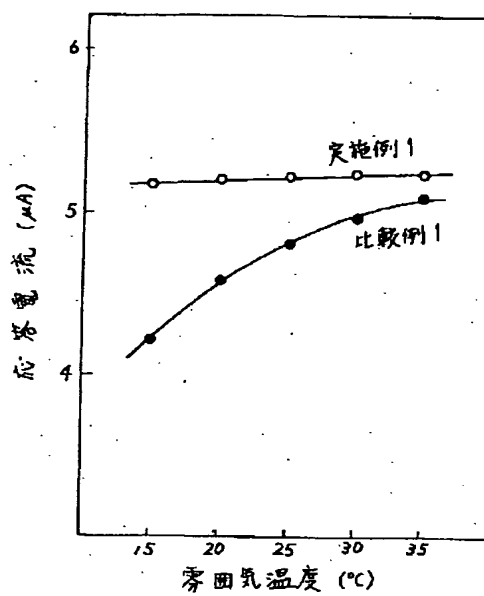
【図1】



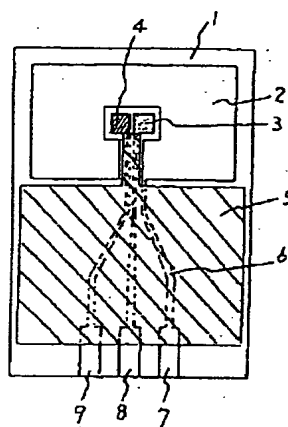
【図2】



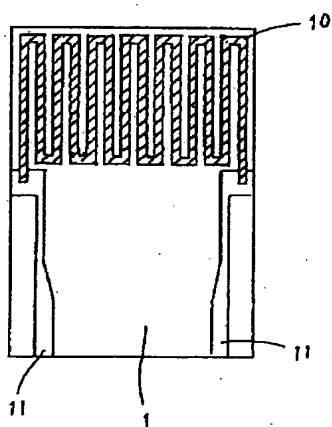
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

